



Förekomst av bakterier i ledvätska hos hundar med ledinflammation – en jämförande studie mellan bakteriologisk odling och DNA-analys (16s rRNA gensekvensering)

Alexandra Vilén¹, Henriette Ström¹, Bo Nilsson², Ann-Cathrine Petersson², Mariana Cigut¹

1. Evidensia Specialistdjursjukhuset Helsingborg 2. Klinisk Mikrobiologi, Lund

Tack till Thure och Karin Forsbergs Stiftelse, Michael Forsgrens Stiftelse samt Stiftelsen Svensk Djursjukvård för ekonomiskt stöd

Syfte & praktisk nytta

Syftet med denna studie är att undersöka om DNA-analys (16s rRNA gensekvensering) kan vara ett värdefullt diagnostiskt hjälpmedel vid septisk artrit hos hund för att påvisa bakterier.

En snabb och pålitlig metod för att påvisa bakterier i ledvätska kan leda till bättre prognos för drabbade hundar samt att antibiotika-behandling undviks där det inte behövs.

Bakgrund

Septisk artrit (SA)

- Ovanlig men allvarlig ledsjukdom som orsakas av bakterier.
- Bakterier kan infektera en led via kirurgiska ingrepp, bit- eller hudskador samt genom spridning med blodet.
- Snabb och korrekt behandling (ledspolning och antibiotikabehandling) är avgörande, annars kan hunden få bestående ledskada.
- Typiska symtom på SA är akut uppkommen håla och smärta från en led. Utöver detta kan en mängd olika symtom ses som feber, trötthet, stelhet, nedsatt aptit samt en ovilja att gå.

För att ställa diagnosen SA undersöks ledvätskan i mikroskop och en bakteriologisk odling utförs.

- Det är svårt att odla fram bakterier i ledvätska (lyckas bara hos cirka 50 % av hundar med SA).
 - Därför kan diagnosen SA sällan definitivt fastställas, utan en trolig diagnos får ställas med ledning av
 - sjukdomshistoria
 - klinisk undersökning
 - mikroskopisk undersökning av ledvätska
 - utvärdering av hur patienten svarar på antibiotika.
- Liknande svårigheter att påvisa bakterier vid SA hos människa, varför **DNA-analys** ibland används som komplement till bakteriologisk odling.
- DNA-analys är en avancerad samt mycket känslig process och det förekommer både falska positiva och falska negativa resultat.
- Få studier på djur där DNA-analys använts för att diagnosticera SA men hittills har detta inte visat sig vara mer värdefullt än bakteriologisk odling hos häst och hund.

Studiens utförande

Studerade hundar

Hundar behandlade vid Evidensia Specialistdjursjukhus Helsingborg, 2010-2013.

- Tio hundar med misstänkt SA (håla från en led samt förhöjt antal vita blodkroppar i ledvätskan).
- Kontrollgrupp 1) Nio hundar med lindrig kronisk ledinflammation (på grund av osteoartros, osterochondros eller främre korsbandsskada med ingen eller mycket lindrig ökning av vita blodkroppar i ledvätskan).
- Kontrollgrupp 2) Nio hundar med misstänkt immunmedierad polyartrit (håla från flera leder, inte orsakat av bakterier samt förhöjt antal vita blodkroppar i ledvätskan).

Utförda undersökningar

- Mikroskopisk undersökning av ledvätskan.
- Bakteriologisk odling av ledvätskan efter inkubering under 24h i 37°C, i en särskild flaska med bakterienäring (avsedd för små barn med misstänkt blodförgiftning).
- DNA-analys av ledvätskan vid Klinisk Mikrobiologi i Lund med så kallad Broad Range PCR (16 s rRNA gensekvensering).
 - I väntan på analys förvarades proverna i -20°C.
- Blodprovsundersökning

Resultat

	Positiv bakteriologisk odling	Positiv 16s rRNA
Hundar med SA n=10	7	2
Kontrollgrupp 1 n=9	0	0
Kontrollgrupp 2 n=14	0*	0

Tabell 1
Resultat av odling och DNA-analys hos de olika grupperna av hundar.
n= antal undersökta leder.

*= I ett prov påvisades ett fåtal bakterier, bedömt som kontamination (förorening)



Diskussion och sammanfattning

➢ I vår studie påvisades färre positiva fall av bakterier i ledvätska med DNA-analys än med bakteriologisk odling hos hundar med SA.

- I tidigare studier på hund och häst med SA har ingen skillnad mellan DNA-analys och bakteriologisk odling påvisats.

➢ Vi odlade fram bakterier hos hundar med SA i högre utsträckning (70%) än vad som anses vara genomsnittligt (50%).

- En orsak till detta kan vara att i vår studie inkuberades ledvätskan i en särskild flaska avsedd för små barn. Mindre mängd ledvätska krävs då än om flaskor för vuxna används.

➢ Fler studier avseende DNA-analys vid SA hos hund behövs. Bland annat skulle den optimala hanteringen av ledvätskeprover fram till DNA-analys kunna undersökas.

- Proverna i denna studie är skickade till ett kliniskt laboratorium (samma som humanvården använder sig av).
- Frysförvaring inför DNA-analys anses vara rutin om inte proverna analyseras direkt. Frysning kan dock vara skadligt för bakterie-DNA. Detta kan vara särskilt känsligt om det redan är få bakterier i provet som det ofta är i ledvätska.

- Upparbetning av proverna inför DNA-analys är komplex och kan medföra att mängden DNA i provet minskar.

Utvalda referenser

1. Bennett DT, D.J. Bacterial infective arthritis.pdf. J small Anim Prac (1988);29:207-230.
2. Bonilla H, Kepley R, Pawlak J, et al. Rapid diagnosis of septic arthritis using 16S rDNA PCR: a comparison of 3 methods. Diagn Microbiol Infect Dis 2011;69:390-395.
3. Clements DNG, R.N.A.; Tattersall, J.; Carmichael, S.; Bennett, D. Type I immune-mediated polyarthritis in dogs 39 cases (1997-2002).pdf. JAVMA 2004;224:1323-1327.
4. Clements DN, Owen MR, Mosley JR, et al. Retrospective study of bacterial infective arthritis in 31 dogs. J Small Anim Pract 2005;46:171-176.
5. Jacques D, Cauzinille L, Bouvy B, et al. A retrospective study of 40 dogs with polyarthritis. Vet Surg 2002;31:428-434.
6. Marchevsky AM, Read RA. Bacterial septic arthritis in 19 dogs. Aust Vet J 1999;77:233-237.
7. Muir P, Fox R, Wu Q, et al. Seasonal variation in detection of bacterial DNA in arthritic stifles of dogs with cranial cruciate ligament rupture using PCR amplification of the 16S rRNA gene. Vet Microbiol 2010;141:127-133.
8. Pille F, Martens A, Schouls LM, et al. Detection of bacterial DNA in synovial fluid from horses with infectious synovitis. Res Vet Sci 2004;77:189-195.
9. Pille F, Martens A, Schouls LM, et al. Broad range 16S rRNA gene PCR compared to bacterial culture to confirm presumed synovial infection in horses. Vet J 2007;173:73-78.
10. Scharf VF, Lewis DD, Wellehan JF, et al. Comparison of synovial fluid culture and 16S rRNA PCR in dogs with suspected septic arthritis. Aust Vet J 2015;93:204-207.